

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-103653

(43)公開日 平成8年(1996)4月23日

(51)Int.Cl. [*]	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
B 01 J 20/26	H			
G 01 N 30/48	R			
// A 61 M 1/36	5 4 5			
G 01 N 33/566				

審査請求 未請求 請求項の数6 O.L. (全5頁)

(21)出願番号 特願平6-238677

(22)出願日 平成6年(1994)10月3日

(71)出願人 000109543
テルモ株式会社
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号
(72)発明者 大西 賢人
神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地
テルモ株式会社内

(54)【発明の名称】 刺激応答型分離材料及びその製造方法

(57)【要約】

【目的】標的物質に対する高い特異性を有し細胞を簡便に回収できる分離材料及び分離システムを提供することを目的とする。

【構成】標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する刺激応答型分離材料。

【請求項2】標的物質に対して親和性を有する分子鎖と刺激応答性領域よりなる分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体を主成分として構成された表面を有する請求項1の刺激応答型分離材料。

【請求項3】刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体を主成分とする表面を形成させた後、標的物質に対して親和性を有する物質を該共重合体の反応性官能基に固定化することを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

【請求項4】刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体に、標的物質に対して親和性を有する物質を該共重合体の反応性官能基に結合させた後、基材表面上に保持させることを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

【請求項5】刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体と、標的物質に対して親和性を有する物質とを含む溶液を基材表面上に塗布した後、お互いを反応させることを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

【請求項6】標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する刺激応答型分離材料を用いて、標的物質を該分離材料に結合させた後、刺激応答性高分子鎖の高次構造を変化させることにより、標的物質を該分離材料より脱離させることを特徴とする物質の分離精製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、標的物質に対して特異的親和性を有する物質と刺激応答性高分子とを利用した新規な分離材料及び分離方法に関する。

【0002】

【從来の技術】近年、細胞工学や遺伝子工学等の発展に伴い、細胞や遺伝子を利用した細胞治療や遺伝子治療の研究が盛んとなっており、目的とした細胞や生体物質を損傷させることなく分離する技術が重要となっている。また、バイオテクノロジーの発展により、生物工学的手法によるペプチド、蛋白質、糖蛋白質といった生理活性分子の生産が行われるようになってきており、細胞やバイオプロダクツの簡便で損傷の少ない分離精製技術が望まれている。

【0003】従来より化学工業分野で使用されている吸着・分配・蒸留・析出といった分離・精製の単位操作では、熱や有機溶媒の添加などにより、被精製物質に対し

て大幅な環境変化を強いるため、前述の細胞やバイオプロダクツの分離には適していないことが多い。

【0004】細胞やバイオプロダクツの分離方法として、体積（分子量）や密度による方法（沈降速度法、密度勾配遠心法、ゲル濾過法など）、電場中での移動度の差による方法（電気泳動など）、等電点による方法（焦点電気泳動など）、2液相間への分配による方法（2層分配法、分配クロマトグラフィー）、固相への吸着性の差による方法（吸着クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー）などが知られている。

【0005】これらの分離方法の多くは、物理化学的性状が大きく異なる細胞成分の分離には適用できるものの、物理化学的性状が良く似た成分や細胞、例えばリンパ球亜集団の分離などには適用が困難であった。この中で標的物質に対する選択性の高い方法は、アフィニティーコロマトグラフィーであり、近年広く利用されるようになってきている。細胞を対象とするアフィニティーコロマトグラフィートとしては、標的細胞の表層に存在する膜蛋白質に対するモノクローナル抗体を結合したビーズやシャーレを用いた分離方法が報告されており、本方法による各種リンパ球の亜集団分離も報告されている。

（例えば、ジャーナル・オブ・イミュノロジカル・メソッド、第54号、251ページ、1983年に記載されているブラウンらの研究報告）この抗体を用いた方法は、特異性が極めて高いことで利点であるが、欠点として、吸着した細胞の脱着が困難なこと、抗体が細胞表層の抗原に結合するための時間（接觸時間）を長くする必要があること、その結果、非特異的な吸着が増加すること、などがあった。

【0006】前述の欠点を改良した方法としては、アビジン-ビオチンのような親和性の高い結合を利用して、短時間で分離材料に吸着させる方法がWO91/16116で提案されている。にすなわち、ビオチンで標識した抗体を予め時間をかけて標的細胞に結合させた後、アビジンを結合した分離材料に吸着させることにより、短時間で効率良く標的細胞を分離できることとなる。しかしながら、この方法では、物理的振動を用いて抗体と標的細胞の結合やアビジンとビオチンとの結合を解離することにより標的細胞の回収が行われているため、ビーズ同士の衝突等による細胞の損傷や機能低下が免れない。

【0007】細胞機能を損なわないように回収する方法としては、特開平2-211865に記載された水に対する上限または下限臨界溶解温度が0~80°Cにあるポリマーもしくはコポリマーで表面を被覆した細胞培養基材が報告されている。この方法は、温度により疎水性-親水性と相転移する温度応答性高分子を利用したものであり、温度応答性高分子が疎水性で収縮した状態の時に細胞を吸着させた後、温度を変化させ、親水性となって膨潤するときに吸着した細胞を脱着させる方法である。

この方法の欠点は、細胞に対する特異性が低いため、種

々の細胞が存在する液体から特定の細胞を回収することができないことがある。特に、マクロファージ、白血球、リンパ球などの多くは、曲率の小さい表面に吸着することがしられており、フィルターや不織布形状に加工したこの分離材料を用いて、特定のリンパ球などを選択的に回収することは不可能であった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は、標的物質に対する高い特異性を有し細胞を簡便に回収できる分離材料及び分離システムを提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】上記発明の目的は以下の刺激応答型分離材料及びその製造方法によって達成される。

(1) 標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する刺激応答型分離材料。

(2) 標的物質に対して親和性を有する分子鎖と刺激応答性領域よりなる分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体を主成分として構成された表面を有する(1)の刺激応答型分離材料。

(3) 刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体を主成分とする表面を形成させた後、標的物質に対して親和性を有する物質を該共重合体の反応性官能基に固定化することを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

(4) 刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体に、標的物質に対して親和性を有する物質を該共重合体の反応性官能基に結合させた後、基材表面上に保持させることを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

(5) 刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体と、標的物質に対して親和性を有する物質とを含む溶液を基材表面上に塗布した後、お互いを反応させることを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

(6) 標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する刺激応答型分離材料を用いて、標的物質を該分離材料に結合させた後、刺激応答性高分子鎖の高次構造を変化させることにより、標的物質を該分離材料より脱離させることを特徴とする物質の分離精製方法。

【0010】本発明においては、標的物質は特に限定されず、蛋白質、糖蛋白質、核酸、細胞、人工細胞、合成高分子化合物などを例示できる。本発明の分離材料は、標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分

子鎖よりなる領域とを表面に有する材料であり、表面が相分離していることが特徴である。従って、標的物質に對して親和性を有する分子(リガンド)が、相分離構造に従ってミクロ的に不均一に存在することが特徴となるが、その際、標的物質の大きさが該標的物質に對して親和性を有する領域の大きさより小さいことが好ましい。相分離構造を形成させる方法としては、ブロックもしくはグラフト共重合体を用いる方法が好ましい。高分子間で相溶性を示すものもあるが、多くの高分子は相分離を起こすことが知られている。特に、ブロックもしくはグラフト共重合体は、海島状、縞状、ラメラ状に規則的なミクロ相分離構造を発現することが知られているおり、このような構造が本発明の分離材料としては好ましい。表面における標的物質の親和性領域の比率は、外部環境により異なるため明確に規定できないが、標的物質を吸着する時に、10~90%、好ましくは、20~80%である。

【0011】標的物質としては、サイズが大きい「細胞」を好適に例示できる。また、細胞を標的とした場合、該細胞に對して親和性を有する分子(リガンド)が、相分離構造に従ってミクロ的に不均一に存在しているため、細胞が分離材料表面に吸着されるときにしばしば観察されるキャッピング現象が回避されソフトに吸着することとなる。そのため、細胞の損傷が少なくなり、吸着した細胞の機能を発現させる場合や分離精製(回収)する場合に、優れた性能を発現することとなる。標的とする細胞は限定されず、例えば、上皮系細胞、肝実質細胞、肺ラ島細胞、マクロファージ、単核球、NK細胞(CD56+)、血液幹細胞などの未分化細胞(CD34+)、Bリンパ球、Tリンパ球、及びそのサブセット(CD4+、CD8+、CD19+、CD71+、IL2R+など)、各種の腫瘍細胞や機能細胞等より、目的に応じて選定される。

【0012】刺激応答性高分子とは、熱、PH、電位、光などにより高次構造が変化して、水溶液中で膨潤したり収縮する高分子であればよい。例えば、水に対する上限臨界温度または下限臨界温度を有し、温度変化に応答して、膨潤・収縮する高分子を好適に例示できる。そのような高分子としては、N-イソプロピルアクリラミドやN,N-ジエチルアクリラミド、N-イソプロピルメタアクリラミドなどのアクリラミドやメタアクリラミドの誘導体類をはじめ、ビニルメチルエーテルなどのビニルエーテル類などのポリマーやコポリマーを例示できる。また、光により構造変化させる場合は、例えば、アゾベンゼン基を有する吸水性高分子のように光異性化をおこす高分子、トリフェニルメタンロイコハイドロオキシドのビニル誘導体とアクリラミド系单量体との共重合体のように光イオン解離する感應基を有する温度応答性高分子、スピロベンゾピランを含むN-イソプロピルアクリラミドゲルのように疎水性相互作用

が光変化する温度応答性高分子などを用いることができる。

【0013】電気化学的に構造変化を生じさせるには、ビニルフェロセンとイソプロピルアクリルアミド共重合体のようにフェロセニル基を側鎖に有する温度応答性高分子を例示することができる。フェロセニル基は、還元状態では疎水性の官能基であるが、酸化されると親水性が高まるため、一定の温度領域で電気化学的に膨潤～収縮を制御することができる。

【0014】電気や光により制御できる温度領域は、アルキルアクリルアミドのような温度応答性高分子を形成するモノマーに親水性モノマーや疎水性モノマーを少量共重合させることにより、任意に制御することが可能である。たとえば、疎水性モノマーを共重合させると相転移温度は低くなり、親水性モノマーを共重合させると相転移温度は高くなる。

【0015】イオンにより構造変化を誘導したり加速するためには、イオン解離する官能基を有するモノマーを共重合したり、イオンを捕捉する分子を側鎖に導入させてやればよい。例えば、ナトリウムやカリウムを認識するクラウンエーテル（ベンゾ[18]クラウン-6）を側鎖にポリソプロピルアクリルアミドは、ナトリウムイオンやカリウムイオンにより相転移が引き起こされる。

【0016】標的物質に対して親和性を有する領域には、抗原-抗体、酵素-基質（阻害剤）、各種の生理活性物質とそのレセプターとの反応などの生体の制御機構で見られる特異的親和性により標的物質を吸着するリガンドや、静電相互作用、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス相互作用等によって標的物質に対して親和性を示す合成化合物やそれらの相互作用を効果的に発現できるよう人工的に設計された分子認識素子などが存在する。

【0017】標的物質に対して親和性を有する領域は、刺激応答性高分子鎖と必ずしも化学的に結合していないともよく、ブレンド法や積層法を利用して相分離構造を形成させてもよい。また、金属、セラミック、あるいは有機物よりなる直径5μ以下、好ましくは2μ以下の微粉体などを利用して不均一構造を形成させ、該微粉体上に標的細胞に対して親和性を有する物質を結合させることも可能である。

【0018】リガンドの反応性官能基への固定化は、公知の化学反応を用いた方法で達成できるが、両者の結合の間に、スペーサーや2種以上の化合物よりなる結合が存在していてもよい。結合様式としては、生理的条件で容易に脱離しないことが望ましいが、必ずしも共有結合である必要はなく、イオンコンプレックスや電荷移動錯体などを利用した結合でもかまわない。また、生理的条件で高い親和性を有するビオチン-アビジン、ビオチン-アストレプトアビジン、リボフラビン-リボフラビン結合蛋白、プロテインA-IgG、プロテインG-IgG

などの生化学的親和性を利用した結合であってもよい。ビオチン-アビジンの組み合わせは、ビオチン標識抗体などが市販されており容易に入手できるため、標的物質に対する抗体をアビジンを介して反応性官能基に固定化することができる。

【0019】反応性官能基とは、標的物質に対して親和性を有するリガンドを結合できる官能基であれば良く、カルボキシル基、アルデヒド基、アミノ基、イミノ基、スルホン酸基、エポキシ基、イソシアネート基、酸クロリド基、ヒドロキシ基、チオール基、ジスルフイド基などの官能基を例示できる。また、カルボニルジイミダゾール、トシリ、トレシルなどで活性化されていてもかまわない。これらの官能基を利用して、直接あるいは縮合剤や架橋剤を用いて、標的物質に対するリガンドを結合することが可能である。反応性官能基がエポキシ基のように、直接アミノ基やカルボキシル基と反応するタイプであると反応操作が簡略化できるため好ましい。ヒドロキシ基のように反応性の低い官能基の場合、両末端に反応性の高い官能基を有する架橋剤、例えばポリイソシアネート類、ポリエポキシ化合物、ジアルデヒド化合物などを利用してリガンドを固定化することも可能である。

【0020】反応性官能基を有する分子鎖を形成させる方法は、公知の方法でかまわない。例えば、官能基を有する単量体を重合したり、他の単量体と共に重合することにより反応性官能基を有する分子鎖を形成させる方法や、すでに形成された分子鎖を化学修飾することにより反応性の高い官能基を導入する方法などを例示できる。分離材料の形態は、特に限定されず、プレート状、シャーレ状、繊維状、不織布状、多孔質膜、多孔質フィルター、ビーズなどを例示でき、それぞれの形態にあったカラムなりモジュールに収納されて使用されてもかまわない。また、その基材となる材質についても水に対して非溶解性であれば特に限定されず、ポリオレフィン、ハロゲン化ポリオレフィン、ポリウレタン、ポリアミド、ポリエステル、綿、ポリスチレン、及びそれらの変性物や共重合体など、既存の材料を例示することができる。

【0021】分離材料に吸着した標的物質の回収は、温度、光、電気等の刺激により刺激応答性高分子の高次構造を急速に変化せしめることにより行う。例えば、刺激応答性領域が収縮した条件下でリガンドが表面に存在する分離材料の場合、この状態で標的物質を吸着させた後、外部刺激により刺激応答性領域を膨潤させることにより、その急激な環境変化を利用して標的物質が材料表面より脱着することとなる。脱着させた場合の回収率は、固定化したリガンドの種類や状態、刺激応答領域と吸着領域の構造や組成比により異なり、使用条件に応じた条件設定が必要となるが、50%以上、好ましくは80%以上である。

【0022】標的物質と刺激応答性高分子の間に弱い結合が存在する場合、その結合を解離することによって標

的物質を脱離させてもかまわない。回収率の向上などを目的として、必要に応じて物理的な方法や化学的な方法を併用してもかまわない。

【0023】

【実施例】

(実施例1) 標的物質としてCD4⁺細胞を設定し、標的物質に対して特異的親和性を有する物質としてCD4に対する抗体、刺激応答性高分子としてポリ(N-ジエチルアクリルアミド)を用いて分離用吸着材料を作製し、CD4⁺細胞の分離を検討した。

【0024】主鎖にアゾ基を有するポリグリシジルメタクリレートを重合開始剤として、N,N-ジエチルアクリルアミドをジメチルスルホキシド中で80℃、16時間重合し、石油エーテル中で再沈殿させた後、ポリマーを減圧乾燥させることにより、刺激応答性ドメインとしてポリ(N,N-ジエチルアクリルアミド)、反応性ドメインとしてポリ(グリシジルメタクリレート)を有するブロックコポリマー(モル組成比3:1)を得た。

【0025】このブロック共重合体の3%ジオキサン溶液を、厚さ100μのポリウレタンシートにコーティングした。続いて、0.01wt%のポリエチレンイミン(平均分子量1200)を含むCD4抗体の5mg/ml溶液をコーティングした後、38℃で16時間反応させることにより、刺激応答型分離材料を得た。

【0026】この材料に、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加PBSで洗浄して調整した白血球液(1×10⁶/ml)を37℃で接触させることにより、CD4⁺細胞を吸着させた。位相差顕微鏡を用いて、吸着細胞の脱着を観察したところ、1%アルブミンを添加したPBSで25℃でリンスすることにより脱着できることを確認した。

【0027】(実施例2) 1.0%のポリメタクリル酸を溶解させたDMSO溶液と、実施例1で作製したブロックコポリマーの4%DMSO溶液を1:1で混合した後、ポリメタクリル酸を表面グラフト重合したポリエチレンシートにコーティングした後、60℃40時間反応させた。続いて、5mg/mlの1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(シグマ社製)溶液を20ml(pH5.5)シャーレに注入し、5分間室温で浸漬させた。続いて、CD4抗体の5mg/ml溶液と接触させて室温で1時間時々攪拌しながら反応させた後、グリシンを最終濃度で0.2モルとなるように添加して1時間放置した後、リン酸バッファー(PBS)でリンスすることによりCD4⁺細胞分離材料を作

製した。

【0028】この材料に、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加PBSで洗浄して調整した白血球液(1×10⁶/ml)を37℃で接触させることにより、CD4⁺細胞を吸着させた。位相差顕微鏡を用いて、吸着細胞の脱着を観察したところ、1%アルブミンを添加したPBSで25℃でリンスすることにより脱着できることを確認した。

【0029】(実施例3) 主鎖にパーオキサイド基を有するポリグリシジルメタクリレートとメチルアクリレートとの共重合体(1:1)を重合開始剤として、N-イソプロピルアクリルアミドをジメチルスルホキシド中で80℃、16時間重合して、刺激応答性ドメインとしてポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、反応性ドメインとしてポリ(グリシジルメタクリレート-メチルアクリレート共重合体)を有するブロックコポリマー(モル組成比4.8:1)を得た。

【0030】0.5wt%のCD4抗体を含む20%DMSO溶液に上記ポリマー2wt%を含む60%DMSO溶液を1:1で混合した後、ポリメタクリル酸を表面グラフト重合したポリエチレンシートにコーティングし、60℃40時間反応させた。この材料に、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加PBSで洗浄して調整した白血球液(1×10⁶/ml)を37℃で接触させることにより、CD4⁺細胞を吸着させた。位相差顕微鏡を用いて、吸着細胞の脱着を観察したところ、1%アルブミンを添加したPBSで25℃でリンスすることにより脱着できることを確認した。

【0031】
【発明の効果】本発明の分離材料や分離方法は、刺激応答領域と標的物質に対する親和性領域とが存在する。従って、刺激応答領域における体積変化が大きくなり吸着物質の脱着が起こりやすくなる。また、相分離構造を形成させることにより、標的細胞が吸着した場合のキャピング現象を抑制することができるため、機能損傷の少ない高品質の細胞を回収できることとなる。その結果、従来困難であった血球系細胞や機能細胞の分離精製が簡便にできるようになり、本発明の分離材料や技術は、標的細胞の分離、増殖、機能変換等を利用したバイオプロダクツの生産や細胞治療、遺伝子治療、診断等に効果を發揮することとなる。また、本発明は、医療分野のみならず各種の産業分野において新しい分離技術として効果を発現することとなる。

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-103653

(43)Date of publication of application : 23.04.1996

(51)Int.CI.

B01J 20/26
G01N 30/48
// A61M 1/36
G01N 33/566

(21)Application number : 06-238677

(71)Applicant : TERUMO CORP

(22)Date of filing : 03.10.1994

(72)Inventor : ONISHI MASATO

(54) STIMULUS RESPONSE TYPE SEPARATING MATERIAL AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a stimulus response type separating material which has high specificity to target materials and is capable of easily recovering cells by providing the surface of this material with a region having affinity to the target materials and a region consisting of stimulus responsive high-polymer chains.

CONSTITUTION: The surface of this stimulus response type separating material is provided with the region in which artificially designed molecule recognition element, such as control mechanisms of living bodies including reaction of antigen-antibody, enzyme-substrate and various kinds of physiological active materials and their receptors, etc., exist and has affinity with the target materials, such as protein, glycoprotein, nucleic acids, cells, artificial cells and high-polymer compds. The surface is also provided with the region consisting of the stimulus responsive high-polymer chains which are changed in the higher structure by heat, Hz, potential, light, etc., to the target materials and are swollen and shrunk in an aq. soln. As a result, the capping when the target cells are adsorbed in the material is suppressed and the cells which are less damaged in the functions and have high quality are recovered.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 26.09.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Stimulus response type separation material which has the field which has compatibility to the target matter, and the field which consists of a stimulus responsibility macromolecule chain on a front face.

[Claim 2] Stimulus response type separation material of the claim 1 which has the front face constituted considering the block copolymer or graft copolymer which has the chain which has compatibility to the target matter, and the chain which consists of a stimulus responsibility field as a principal component.

[Claim 3] The manufacture method of the stimulus responsibility separation material characterized by fixing the matter which has compatibility to the target matter in the reactant functional group of this copolymer after making the front face which makes a principal component the block copolymer or graft copolymer which has the chain which consists of a stimulus responsibility field, and the chain which has a reactant functional group form.

[Claim 4] The manufacture method of the stimulus responsibility separation material characterized by making it hold on a base-material front face after combining with the reactant functional group of this copolymer the matter which has compatibility to the target matter in the block copolymer which has the chain which consists of a stimulus responsibility field, and the chain which has a reactant functional group, or a graft copolymer.

[Claim 5] The manufacture method of the stimulus responsibility separation material characterized by making each react after applying the solution containing the block copolymer or graft copolymer which has the chain which consists of a stimulus responsibility field, and the chain which has a reactant functional group, and the matter which has compatibility to the target matter on a base-material front face.

[Claim 6] The separation refining method of the matter characterized by desorbing the target matter from this separation material by changing the higher order structure of a stimulus responsibility macromolecule chain after combining the target matter with this separation material using the stimulus response type separation material which has the field which has compatibility to the target matter, and the field which consists of a stimulus responsibility macromolecule chain on a front face.

[Translation done.]

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] this invention relates to a new separation material and the separation method of having used the matter which has specific compatibility to the target matter, and the stimulus responsibility macromolecule.

[0002]

[Description of the Prior Art] In recent years, the research using the cell or the gene of a cell therapy or gene therapy prospers with development of a cell technology, genetic engineering, etc., and the technology separated without damaging the cell and biological substance which were made into the purpose is important. Moreover, production of physiological activity molecules, such as a peptide by the bionics-technique, protein, and quality of glycoprotein, is performed by development of biotechnology techno G, a cell and bioproducts are simple and recovery and purification with few injuries are desired.

[0003] In the unit operation of separation and refining, such as adsorption, distribution, distillation, and a deposit currently conventionally used in the chemical-industry field, in order to force it a large environmental variation to the refined matter, it is suitable for neither the above-mentioned cell nor separation of bioproducts in many cases with addition of heat or an organic solvent etc.

[0004] The methods according to volume (molecular weight) or density as the separation method of a cell or bioproducts (sedimentation velocity method, density gradient centrifugation, gel filtration technique, etc.), The methods (electrophoresis etc.) by the difference of the mobility in the inside of electric field, the method by the isoelectric point, the method (the two-layer distributing method, distribution chromatography air conditioner fee) by distribution of a between [2 liquid phase (electrofocusing etc.)], the method (an adsorption chromatography, affinity chromatography) by the difference of the adsorptivity to solid phase, etc. are learned.

[0005] many of these separation methods are physicochemical — physicochemical, although a character can apply to separation of a greatly different cell component — application was difficult for separation of the component which the character resembled well, or a cell, for example, a lymphocyte subset In this, the method for the target matter that selectivity is high is affinity chromatography, and is used increasingly widely in recent years. The separation method using the bead and petri dish which combined the monoclonal antibody to the film protein which exists in the surface of a target cell as affinity chroma TOGURA foot for a cell is reported, and subset separation of the various lymphocytes by this method is also reported. (For example, Journal of Immunological Method, No. 54, 251 pages, Brown's and others research report indicated in 1983) Method using this antibody, Although singularity was an advantage in the very high thing, it being necessary to lengthen time (contact time) for the desorption of the cell to which it stuck being difficult as a fault, and an antibody combining with the antigen of a cortex, consequently un-unique adsorption might increase.

[0006] The method of making it stick to separation material for a short time is proposed by WO 91/16116 using a high combination of compatibility like an avidin-biotin as a method which improved the above-mentioned fault. After combining beforehand with a target cell the antibody which boiled, namely, carried out the indicator by the biotin over many hours, a target cell can be efficiently separated by making it stick to the separation material which combined the avidin in a short time. However, by this method, since recovery of a target cell is performed by dissociating combination of an antibody and a target cell, and combination with an avidin and a biotin using physical vibration, the injury or depression of a cell by the collision of beads etc. do not escape.

[0007] The cell culture base material which covered the front face with the polymer or the copolymer which has the upper limit or minimum critical solution temperature to the water indicated by JP,2-211865,A in 0~80 degrees C as a method of collecting so that a cell function may not be spoiled is reported. This method is the method of carrying out the desorption of the cell to which it stuck when used the temperature responsibility macromolecule which carries out phase transition to a hydrophobic-property-hydrophilic property with temperature, changing temperature after making a cell adsorb in the state where the temperature responsibility macromolecule was hydrophobic and contracted, becoming a hydrophilic property and swelling. The fault of this method is that the singularity over a cell cannot collect specific cells from the liquid with which various cells exist for a low reason. Especially many, such as a macrophage, a leucocyte, and a lymphocyte, were impossible for collecting specific lymphocytes etc. alternatively using this separation material that sticking to the front face where curvature is small carried out, and processed the ***** cage, the filter, and the nonwoven fabric configuration.

[0008]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Therefore, this invention aims at offering the separation material and the separation system which have the high singularity over the target matter and can collect cells simple.

[0009]

[Means for Solving the Problem] The purpose of the above-mentioned invention is attained by the following stimulus response type separation material and its manufacture method.

(1) Stimulus response type separation material which has the field which has compatibility to the target matter, and the field which consists of a stimulus responsibility macromolecule chain on a front face.

(2) Stimulus response type separation material of (1) which has the front face constituted considering the block copolymer or graft copolymer which has the chain which has compatibility to the target matter, and the chain which consists of a stimulus responsibility field as a principal component.

(3) The manufacture method of the stimulus responsibility separation material characterized by fixing the matter

which has compatibility to the target matter in the reactant functional group of this copolymer after making the front face which makes a principal component the block copolymer or graft copolymer which has the chain which consists of a stimulus responsibility field, and the chain which has a reactant functional group form.

(4) The manufacture method of the stimulus responsibility separation material characterized by making it hold on a base-material front face after combining with the reactant functional group of this copolymer the matter which has compatibility to the target matter in the block copolymer which has the chain which consists of a stimulus responsibility field, and the chain which has a reactant functional group, or a graft copolymer.

(5) The manufacture method of the stimulus responsibility separation material characterized by making each react after applying the solution containing the block copolymer or graft copolymer which has the chain which consists of a stimulus responsibility field, and the chain which has a reactant functional group, and the matter which has compatibility to the target matter on a base-material front face.

(6) The separation refining method of the matter characterized by desorbing the target matter from this separation material by changing the higher order structure of a stimulus responsibility macromolecule chain after combining the target matter with this separation material using the stimulus response type separation material which has the field which has compatibility to the target matter, and the field which consists of a stimulus responsibility macromolecule chain on a front face.

[0010] In this invention, especially the target matter is not limited but can illustrate protein, glycoprotein, a nucleic acid, a cell, an artificial cell, a synthetic high polymer, etc. The separation material of this invention is a material which has the field which has compatibility to the target matter, and the field which consists of a stimulus responsibility macromolecule chain on a front face, and it is the feature that the front face is carrying out phase separation. Therefore, although it becomes the feature that the molecule (ligand) which has compatibility to the target matter exists unevenly in micro according to phase separation structure, it is desirable in that case that the size of the target matter is smaller than the size of the field which has compatibility to this target matter. The method using a block or a graft copolymer as a method of making phase separation structure forming is desirable. Although there are some which show compatibility between macromolecules, it is known that many macromolecules will start phase separation. Especially a block or a graft copolymer has desirable cage and such structure where discovering micro phase separation structure regular the shape of the shape of **** and stripes and in the shape of a lamellae is known, as a separation material of this invention. Although it cannot specify clearly since it changes with external environments, the ratio of the compatibility field of the target matter in a front face is 20 – 80% preferably 10 to 90%, when adsorbing the target matter.

[0011] As target matter, a "cell" with large size can be illustrated suitably. Moreover, since the molecule (ligand) which has compatibility to this cell exists unevenly in micro according to phase separation structure when a cell is made into a target, the capping phenomenon by which a cell is often observed when a separation material-list side is adsorbed will be avoided, and it will adsorb soft. Therefore, the injury on a cell decreases, and the outstanding performance will be discovered, when making the function of a cell in which it adsorbed discover, or when carrying out separation refining (recovery). The cell made into a target is not limited, for example, is selected from undifferentiated cells (CD34+), such as an epithelium system cell, a hepatocyte, pancreas RA islet cell, a macrophage, a monocyte, a spontaneous killer cell (CD56+), and a blood stem cell, a B lymphocyte, a T lymphocyte and its subset, various kinds of tumor cells (CD4+, CD8+, CD19+, CD71+, IL2R+, etc.), a functional cell, etc. according to the purpose.

[0012] A stimulus responsibility macromolecule should just be a macromolecule which higher order structure changes with heat, PH, potential, light, etc., and swells in solution or is contracted. For example, it has the upper limit critical temperature or minimum critical temperature to water, a temperature change is answered, and it swells. – The macromolecule to contract can be illustrated suitably. As such a macromolecule, the derivatives of acrylamides, such as N-isopropyl acrylamide, N and N-diethyl acrylamide, and an N-isopropyl meta-acrylamide, or a meta-acrylamide are begun, and polymer and copolymers, such as a vinyl methyl ether, can be illustrated. [such as vinyl ether,] Moreover, when making it change structurally by light, the temperature responsibility macromolecule in which a hydrophobic interaction carries out optical change can be used like N-isopropyl acrylamide gel containing the macromolecule which starts photoisomerization like the water absorbing polymer which has an azobenzene machine, the temperature responsibility macromolecule which has the induction machine which carries out optical ionic dissociation like the copolymer of the vinyl derivative of a triphenylmethane-color leuco hydro oxide, and an acrylamide system monomer, and spirobenzopyran.

[0013] In order to produce a structural change electrochemically, a vinyl ferrocene and the temperature responsibility macromolecule which has a ferro SENIRU machine in a side chain like an isopropyl acrylamide copolymer can be illustrated. Although a ferro SENIRU machine is a hydrophobic functional group, since a hydrophilic property will increase if it oxidizes, it can control swelling – contraction by reduced condition electrochemically in a fixed temperature field.

[0014] A temperature field controllable by the electrical and electric equipment or light can be arbitrarily controlled by carrying out little copolymerization of a hydrophilic monomer or the hydrophobic monomer to the monomer which forms a temperature responsibility macromolecule like an alkyl acrylamide. For example, if copolymerization of the hydrophobic monomer is carried out, a phase transition temperature will become low, and if copolymerization of the hydrophilic monomer is carried out, a phase transition temperature will become high.

[0015] What is necessary is to copolymerize the monomer which has the functional group which carries out ionic dissociation, or just to make the molecule which catches ion introduce into a side chain, in order to guide a structural change by ion or to accelerate. For example, as for a PORISO propyl acrylamide, phase transition is caused to a side chain by sodium ion and potassium ion in the crown ether (BENZO [18] crown -6) which recognizes sodium and a potassium.

[0016] The molecular-recognition element artificially designed so that the synthetic compounds which show compatibility to the target matter by the ligand which adsorbs the target matter by the specific compatibility seen with the controlling mechanism of living bodies, such as a reaction of an antigen-antibody, an enzyme-substrate (inhibitor), various kinds of physiological active substances, and its receptor, an electrostatic interaction, a hydrophobic interaction, hydrogen bond, a van der Waals interaction, etc., and those interactions could be discovered effectively exists in the field which has compatibility to the target matter.

[0017] It does not necessarily need to combine with a stimulus responsibility macromolecule chain chemically, and the field which has compatibility to the target matter may make phase separation structure form using the blending

method or a laminated layers method. Moreover, it is also possible to combine the matter which is made to form uneven structure preferably using a pulverized coal 2micro or less etc., and has compatibility to a target cell on this pulverized coal the diameter of 5micro or less which consists of a metal, a ceramic, or the organic substance.

[0018] Although the fixation to the reactant functional group of a ligand can be attained by the method using the well-known chemical reaction, combination which consists of a spacer or two or more sorts of compounds may exist between both combination. Although it is desirable not to **** easily on physiological conditions as a joint format, it is not necessary to be necessarily covalent bond, and combination using ion complex, the electron donor acceptor complex, etc. is sufficient. Moreover, you may be combination using biochemical compatibility, such as a biotin-avidin which has high compatibility on physiological conditions, biotin-streptoavidin, riboflavin-riboflavin joint protein, protein A-IgG, and protein G-IgG. Since the biotin labelled antibody etc. is marketed and the combination of a biotin-avidin can come to hand easily, it can fix the antibody to the target matter in a reactant functional group through an avidin. [0019] Functional groups, such as a carboxyl group, an aldehyde group, the amino group, an imino group, a sulfonic group, an epoxy group, an isocyanate machine, an acid-chloride machine, a hydroxy group, a thiol group, and a disulfide machine, can be illustrated that a reactant functional group should just be a functional group which can combine the ligand which has compatibility to the target matter. Moreover, it may be activated by carbonyldimidazole, the tosyl, tresyl, etc. It is possible to combine the ligand to the target matter using direct or a condensing agent, or a cross linking agent using these functional groups. Since a reactant functional group can simplify reaction operation like an epoxy group as they are the direct amino group, a carboxyl group, and the type that reacts, it is desirable. In the case of a reactant low functional group, it is also possible like a hydroxy group to fix a ligand in both ends using the cross linking agent which has a reactant high functional group, for example, the poly isocyanates, the poly epoxy compound, a dialdehyde compound, etc.

[0020] A well-known method is sufficient as the method of making the chain which has a reactant functional group form. For example, the method of making the chain which has a reactant functional group forming, the method of introducing a reactant high functional group by carrying out chemical modification of the already formed chain, etc. can be illustrated by carrying out the polymerization of the monomer which has a functional group, or copolymerizing with other monomers. Especially the gestalt of separation material is not limited, but can illustrate the shape of the shape of a plate, and a petri dish, fibrous, nonwoven blanket-like one, a porous membrane, a porosity filter, a bead, etc., and it may be used by the module, containing it in the column which suited each gestalt. Moreover, about the quality of the material used as the base material, especially if it is undissolved to water, it will not be limited, either, but a polyolefine, a halogenation polyolefine, polyurethane, a polyamide, polyester, cotton, polystyrene, those denaturation objects, copolymers, etc. can illustrate the existing material.

[0021] Recovery of the target matter which stuck to separation material is performed by making the higher order structure of a stimulus responsibility macromolecule change with stimuli of temperature, light, the electrical and electric equipment, etc. quickly. For example, after making the target matter adsorb in this state in the case of the separation material to which a ligand exists in a front face under the conditions which the stimulus responsibility field contracted, the target matter will carry out [***** / which makes a stimulus responsibility field swell by external stimulus] desorption from a material-list side using the rapid environmental variation. The recovery at the time of carrying out desorption is 80% or more preferably 50% or more, although it changes with the structures and the composition ratios of the kind and state of a ligand, a stimulus response field, and an adsorption field which were fixed and the conditioning according to the service condition is needed.

[0022] When weak coupling exists between the target matter and a stimulus responsibility macromolecule, you may desorb the target matter by dissociating the combination. You may use a physical method and a chemical method together if needed for the purpose of improvement in recovery etc.

[0023]

[Example]

(Example 1) The CD4+ cell was set up as target matter, as matter which has specific compatibility to the target matter, the adsorption material for separation was produced using poly (N-diethyl acrylamide) as the antibody to CD4, and a stimulus responsibility macromolecule, and separation of a CD4+ cell was considered.

[0024] Let the polyglycidylmethacrylate which has an azo machine in a principal chain be a polymerization initiator. After carrying out the polymerization of the 80 degrees C of the N and N-diethyl acrylamides in dimethyl sulfoxide for 16 hours and making them reprecipitate in the petroleum ether, the block copolymer (mol composition ratio 3:1) which has poly (glycidyl methacrylate) as poly (N and N-diethyl acrylamide) and a reactant domain as a stimulus responsibility domain was obtained by carrying out reduced pressure drying of the polymer.

[0025] The polyurethane sheet with a thickness of 100micro was coated with 3% dioxane solution of this block copolymer. Then, after coating 5mg [/ml] solution of CD4 antibody containing 0.01wt% polyethyleneimine (average molecular weight 1200), stimulus response type separation material was obtained by making it react at 38 degrees C for 16 hours.

[0026] The CD4+ cell was made to adsorb by contacting the leucocyte liquid (1x106-/ml) which washed into this material by the albumin addition PBS 1%, and was adjusted to it from the man fresh-blood buffy coat at 37 degrees C. When the desorption of an adsorption cell was observed using the phase-contrast microscope, it checked that desorption could be carried out by carrying out a rinse at 25 degrees C by PBS which added albumin 1%.

[0027] (Example 2) After coating to polyethylene RENSHI-TO which carried out the surface graft polymerization of the polymethacrylic acid after mixing 4%DMSO solution of the block copolymer produced in the example 1 with the DMSO solution in which 1.0% of polymethacrylic acid was dissolved by 1:1, 60 degrees C was made to react for 40 hours. Then, you poured the 5mg [/ml] 1-ethyl-3-(dimethylamino propyl) carbodiimide (sigma company make) solution into 20ml (pH 5.5) petri dish, and made it immersed at a room temperature for 5 minutes. Then, after having added the glycine so that it might become 0.2 mols by the last concentration after making it react, having made 5mg [/ml] solution of CD4 antibody contact, and sometimes agitating at a room temperature for 1 hour, and leaving it for 1 hour, CD4+ cellular segregation material was produced by carrying out a rinse with a phosphoric-acid buffer (PBS).

[0028] The CD4+ cell was made to adsorb by contacting the leucocyte liquid (1x106-/ml) which washed into this material by the albumin addition PBS 1%, and was adjusted to it from the man fresh-blood buffy coat at 37 degrees C. When the desorption of an adsorption cell was observed using the phase-contrast microscope, it checked that desorption could be carried out by carrying out a rinse at 25 degrees C by PBS which added albumin 1%.

[0029] (Example 3) Let the copolymer (1:1) of the polyglycidylmethacrylate and methyl acrylate which have a peroxide

machine in a principal chain be a polymerization initiator. The polymerization of the 80 degrees C of the N-isopropyl acrylamides was carried out in dimethyl sulfoxide for 16 hours, and the block copolymer (mol composition ratio 4.8:1) which has poly (glycidyl methacrylate-methyl acrylate copolymer) as poly (N-isopropyl acrylamide) and a reactant domain as a stimulus responsibility domain was obtained.

[0030] 0. After mixing 60%DMSO solution which contains the above-mentioned polymer 2wt% in 20%DMSO solution containing CD4 5wt% antibody by 1:1, the polyethylene sheet which carried out surface graft polymerization was coated with the polymethacrylic acid, and it was made to react 60 degrees C for 40 hours. The CD4+ cell was made to adsorb by contacting the leucocyte liquid (1×10^6 /ml) which washed into this material by the albumin addition PBS 1%, and was adjusted to it from the man fresh-blood buffy coat at 37 degrees C. When the desorption of an adsorption cell was observed using the phase-contrast microscope, it checked that desorption could be carried out by carrying out a rinse at 25 degrees C by PBS which added albumin 1%.

[0031]

[Effect of the Invention] A compatibility field [as opposed to a stimulus response field and the target matter in the separation material or the separation method of this invention] exists. Therefore, the volume change in a stimulus response field becomes large, and the desorption of an adsorbate becomes easy to happen. Moreover, since a KYAPINGU phenomenon when a target cell adsorbs by making phase separation structure form can be suppressed, quality cells with few functional injuries can be collected. Consequently, it will come to be able to perform separation refining of the conventionally difficult corpuscle system cell or a functional cell simple, and the separation material and technology of this invention will demonstrate an effect to the production and the cell therapy using separation of a target cell, proliferation, functional conversion, etc. of bioproducts, gene therapy, a diagnosis, etc. Moreover, this invention will discover an effect as new separation technology not only in a medical field but in various kinds of industrial fields.

[Translation done.]